

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Dino Jurić

**Utjecaj pH ekstrakcije na elektroforetski profil
albumina i globulina ječma**

završni rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA
PREHRAMBENO–TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Završni rad

**Utjecaj pH ekstrakcije na elektroforetski profil
albumina i globulina ječma**

Nastavni predmet

Biokemija

Predmetni nastavnik: izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec

Student/ica: Dino Jurić (MB: 3358/10)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec

Predano (datum): 1. listopada 2014.

Pregledano (datum): 6. listopada 2014.

Ocjena:

Vrlo dobar (4)

Potpis mentora:

Utjecaj pH ekstrakcije na elektroforetski profil albumina i globulina ječma

Sažetak

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj pH ekstrakcije na raspored i intenzitet proteinskih vrpca albumina i globulina ječma analizom elektroferograma dobivenih nakon provedene poliakrilamid gel elektroforeze u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata. Rezultati su pokazali da je topljivost proteina ječma ovisna o primijenjenom pH. U rasponu pH od 3 do 5 topljivost proteina ječma je najmanja, a porastom pH iznad 6 topljivost proteina ječma značajno raste. Usporedba položaja proteinskih vrpca u elektroferogramima pokazuje da se u rasponu pH od 3 do 5 ekstrahiraju albumini, a iznad pH 6 albumini i globulini.

Ključne riječi: albumini, globulini, ječam, pH ekstrakcije, SDS-PAGE

Electrophoretic Patterns of Barley Albumins and Globulins as Affected by Extraction pH

SUMMARY

Influence of extraction pH on barley albumins and globulins solubility was investigated by SDS-PAGE of proteins extracted from three barley varieties. Obtained electropherograms were analysed on intensity, position, absence and/or presence of protein bands. Results showed high dependence of barley protein solubility on applied extraction pH. The lowest barley protein solubility was found in the pH range from 3 to 5. The increase of pH above 6 caused significant increase in protein solubility. Analysis of obtained protein patterns shows that at pH range from 3 to 5 dominate albumins, while albumins and globulins at pH's above 6.

Key words: albumins, barley, extraction pH, globulins, SDS-PAGE

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	<i>PROTEINI</i>	2
2.2.	<i>UTJECAJ pH NA TOPLJIVOST PROTEINA</i>	3
2.3.	<i>PROTEINI JEČMA I KLASIFIKACIJA PREMA TOPLJIVOSTI</i>	4
2.4.	<i>SDS-PAGE</i>	5
3.	MATERIJALI I METODE	6
3.1.	<i>ZADATAK RADA</i>	6
3.2.	<i>UZORCI, KEMIČALIJE I REAGENCI</i>	6
3.3.	<i>EKSTRAKCIJA ALBUMINA I GLOBULINA JEČMA</i>	6
3.4.	<i>PRIPREMA UZORAKA ZA SDS-PAGE</i>	7
3.5.	<i>SDS-PAGE ALBUMINA I GLOBULINA JEČMA</i>	7
3.5.1.	<i>PROVEDBA ELEKTROFOREZE</i>	7
3.5.2.	<i>BOJANJE PROTEINA</i>	7
4.	REZULTATI I RASPRAVA	9
4.1.	<i>UTJECAJ PH NA RASPORED PROTEINSKIH VRPCI ALBUMINA I GLOBULINA JEČMA PO PROVEDENOJ SDS-PAGE</i>	9
5.	ZAKLJUČCI	13
6.	LITERATURA	14

1. UVOD

Albumini i globulini čine malu, ali metabolički značajnu skupinu proteina ječma. Metabolički značaj ove skupine proteina se prije svega ogleda u činjenici da u nju spada glavna enzima (Koehler-Wieser, 2013.). U ukupnim proteinima ječma albumini su zastupljeni od 10 do 12 %, a globulini od 2 do 18 % (Lásztity, 1999.).

Elektroforetska istraživanja Streleca i suradnika (2012.) pokazuju da se radi o heterogenoj skupini proteina sa rasponom molekulskih masa od svega nekoliko kDa pa čak do 220 kDa, i rasponom izoelektričnih točaka od 3-11, s tim da glavna albumina i globulina posjeduje pI od 3-5.

Ova se skupina proteina iz usitnjenog zrna ječma ili brašna ječma prema klasičnoj Osbornovoj klasifikaciji (1895.) ekstrahira u dva stupnja. U prvom stupnju ekstrakcije se ekstrahiraju albumini pomoću vode, a u drugom stupnju se ekstrahiraju globulini pomoću 0,5 M NaCl. Međutim, u novije vrijeme umjesto zasebne ekstrakcije obje se grupe proteina (tzv. albuminsko/globulinska frakcija) ekstrahiraju pomoću Tris-HCl pufera pH 8,0 ili 8,9 (Strelec i sur., 2012). Štoviše, kako u ovu skupinu proteina pripada glavna enzima, to se zbog analize i stabilnosti enzima primjenjuju puferi različitog pH što dugoročno rezultira različitim informacijama o koncentraciji ekstrahiranih proteina (Strelec, 2004; Strelac, 2007.). Da postoje značajne razlike u količini ekstrahiranih proteina (albumina i globulina) primjenom različitog pH pokazali su i Yalcin i Celik (2007.) u slučaju ječma, te Strelac kako u slučaju ječma (Strelec, 2004.), tako i u slučaju pšenice (Strelec, 2007.). Međutim, usporedna analiza rasporeda i intenziteta proteinskih vrpca u ovisnosti o primjenjenom pH ekstrakcije ne postoji u dostupnoj literaturi.

Stoga je cilj ovoga rada bio ispitati utjecaj pH ekstrakcije na raspored i intenzitet proteinskih vrpca albumina i globulina ječma analizom elektroferograma dobivenih nakon provedene poliakrilamid gel elektroforeze u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata. Ujedno se htjelo ustanoviti pri kojem se pH ekstrahira više albumina, a pri kojem pH više globulina. Stoga su uz ekstrakte proteina dobivene ekstrakcijom pri različitim pH vrijednostima, istovremeno analizirani i albumini ekstrahirani Milli Q vodom, globulini ekstrahirani iz taloga pomoću 0,5 M NaCl nakon ekstrakcije albumina, te albuminsko/globulinska frakcija dobivena direktnom ekstrakcijom pomoću 0,5 M NaCl.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *PROTEINI*

Proteini su polimeri sastavljeni od velikog broja aminokiselina i uz lipide, ugljikohidrate i nukleotide jedni su od osnovnih gradivnih jedinica organizma koje imaju najšarolikiji spektar važnih staničnih funkcija.

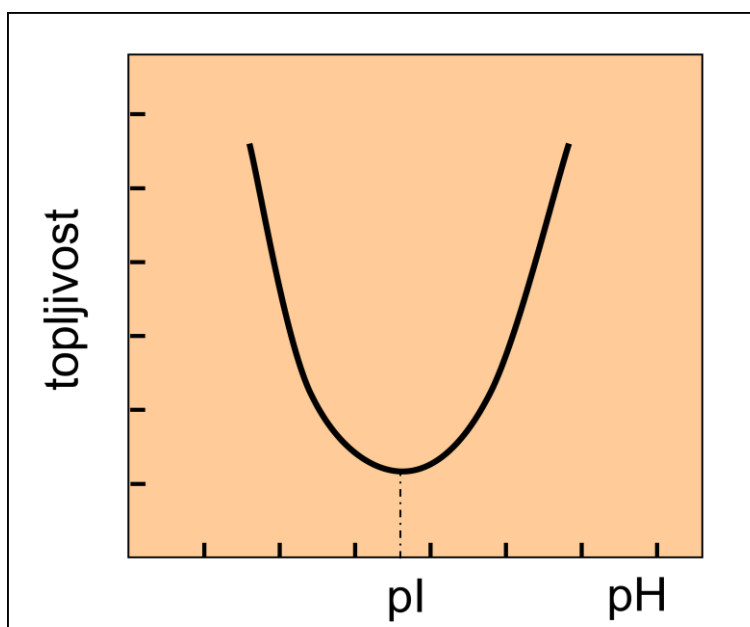
Glavne stanične funkcije proteina jesu:

- kretanje – opće je poznato da su aktin i miozin proteini odgovorni za kontrakciju mišića,
- regulacija - neki proteini djeluju kao receptori na površini stanica i prenose informaciju iz okoline u stanicu vezanjem specifičnih molekula čime dolazi do promjena u staničnom funkcioniranju,
- prijenos i transport – neki su proteini prijenosnici malih molekula i iona kroz membrane ili ih transportiraju krvlju, kao što proteini mioglobin i hemoglobin prenose kisik,
- pohrana - neki proteini služe za pohranu malih molekula ili iona, kao što feritin služi za pohranu željeza u jetri,
- enzimski kataliza - enzimi su proteini koji ubrzavaju biokemijske reakcije i djeluju kao biokatalizatori u stanici,
- mehanička čvrstoća - neki proteini daju stanicama i tkivima čvrstoću, kao što protein kolagen daje koži i kostima veliku čvrstoću pri istezanju,
- imunosna zaštita - određeni proteini (imunoglobulini) prepoznaju strane tvari u našem organizmu (bakterije, virusi), spajaju se s njima i označavaju ih za razgradnju,
- odgovor na stres – neki proteini štite stanicu od stresa, i tako postoje proteini temperaturnog stresa koji se sintetiziraju u stanici pri povišenim temperaturama i omogućuju pravilno re-smatanje denaturiranih proteina (Strelec, 2013.).

2.2. UTJECAJ pH NA TOPLJIVOST PROTEINA

Proteini u vodenim otopinama posjeduju određeni naboj preuzet od kiselih, bazičnih i nekih polarnih aminokiselina, a ukupni naboj proteinskih molekula u izravnoj je ovisnosti o pH. Pri niskom pH (kiselo područje) proteini se nalaze u obliku kationa, a naboj im potječe od nedisociranih amino i karboksilnih skupina. Dodavanjem hidroksilnih iona u otopinu proteina dolazi do disocijacije karboksilnih skupina, koje poprimaju negativan naboj, te pri točno određenom pH proteini prema van djeluju nenabijeno, odnosno nalaze se u izoelektričnoj točki. Daljnjim dodavanjem hidroksilnih iona u otopinu dolazi do disocijacije pozitivno nabijenih amino skupina te se proteini nalaze u obliku aniona.

Kako ukupni naboj proteinskih molekula ovisi o pH, tako je i topljivost proteina u izravnoj ovisnosti o pH (Slika 1).



Slika 1. Ovisnost topljivosti proteina o pH otopine (Strelec, 2013.)

U izoelektričnoj točki, gdje protein djeluje prema van nenabijeno, topljivost proteina je najmanja jer tada protein stvara najmanje vodikovih veza s molekulama vode, a istovremeno se proteinske molekule tako orijentiraju da se pozitivni naboj jedne proteinske molekule spaja sa negativnim nabojem druge proteinske molekule, pojačavajući elektrostatske interakcije između proteinskih molekula. Povišenjem ili sniženjem pH povećava se topljivost proteina, tj. povećava se broj pozitivno ili negativno nabijenih potencijalnih mjesta za stvaranje vodikovih veza između molekula vode i proteinske molekule, što nazivamo protein-otapalo interakcijama. Štoviše, zbog istog naboja na proteinima, elektrostatske interakcije između proteinskih molekula postaju odbojne, tj. slabe. Sve to uzrokuje povećanu topljivost proteina. Naime, što su jače

interakcije između proteina i otapala, a istovremeno slabije interakcije između molekula proteina, to je sama topljivost proteina veća. Suprotno što su jače interakcije između samih proteina (ionska interakcija), a slabije interakcije protein:otapalo, to je topljivost proteina manja (Strelec, 2013.).

2.3. PROTEINI JEČMA I KLASIFIKACIJA PREMA TOPLJIVOSTI

Ječam je žitarica koja botanički gledano pripada porodici trava *Poaceae*. Pripada glavnoj skupini žitarica, koju uz ječam čine pšenica, kukuruz, riža, proso, zob i raž (Koehler-Wieser, 2013.). Ječam se uzgaja za potrebe u industriji piva i slada te kao stočna hrana.

Glavninu kemijskog sastava ječma čine ugljikohidrati (oko 80%), gdje svojim udjelom dominira škrob (55-65%). Ječam sadrži i malu količinu proteina (8-15%) te još manju količinu lipida (0,5-1,5%).

Prema Osborne-ovoj klasifikaciji (1895.), proteini ječma se mogu razvrstati u 4 skupine na osnovi njihove topljivosti:

- albumini – topljivi u vodi,
- globulini – netopljivi u čistoj vodi, ali topljivi u otopinama soli,
- hordeini (prolamini) – topljivi u vodeno-alkoholnom mediju (60-70% etanola) uz reducirajući agens,
- glutelini – netopljivi u vodi, otopinama soli i u vodeno-alkoholnom mediju, ali topljivi u razblaženim otopinama kiselina ili lužina (Strelec, 2004; Koehler-Wieser, 2013.).

Prema funkcionalnoj važnosti većina albumina i globulina ubraja se u skupinu metaboličkih proteina, a hordeini (prolamini) i glutelini pripadaju skupini skladišnih proteina.

Mali dio proteina ne pripada niti jednoj skupini Osbornove klasifikacije prema topljivosti jer ostaje netopljen zajedno sa škrobom te tvori lipo-proteinske membrane (Koehler-Wieser, 2013.).

2.4. SDS-PAGE

Elektroforeza je proces razdjeljivanja proteina pod djelovanjem električnog polja i to prema molekulskoj masi, naboju, izoelektričnoj točki ili kombinaciji nekih od ova tri svojstva. Najčešće se provodi u poliakrilamidnim gelovima, koji služe za razdjeljivanje proteina molekulske mase između 1 000 i 200 000, a rjeđe u agaroznim gelovima, koji služe za razdjeljivanje proteina molekulske mase veće od 200 000.

Postoji nekoliko metoda za razdjeljivanje proteina u poliakrilamidnim gelovima:

- poliakrilamid gel elektroforeza (PAGE) u nativnim uvjetima, koja služi za razdjeljivanje proteina na osnovi njihova naboja i veličine (molekulske mase),
- PAGE u prisustvu natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE), u kojem se proteini razdjeljuju samo na osnovi veličine (molekulske mase),
- Izoelektrično fokusiranje u poliakrilamidnom gelu (PAGE-IEF), kojim se razdjeljuju proteini na osnovi njihove izoelektrične točke te,
- Dvodimenzionalna elektroforeza (2-DE), kojom se razdjeljuju proteini na osnovi dva svojstva (molekulske mase i izoelektrične točke) u dvije dimenzije (Strelec, 2004.).

SDS-PAGE elektroforetska je metoda razdjeljivanja proteina na temelju njihove veličine (molekulske mase) u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS). Natrijev dodecil-sulfat (SDS) je anionski deterdžent koji denaturira i razmata molekule proteina u štapičasti oblik i donosi veliki negativan naboj proteinskim molekulama vežući se svojim hidrofobnim dijelom na hidrofobne ogranke proteina, i izlažući svoj negativni dio otopini. Pomoću količine naboja koji se nalazi na razmotanoj proteinskoj molekuli saznaje se molekulska masa proteina jer je količina naboja proporcionalna molekulskoj masi (Strelec, 2009.).

Nakon završetka elektroforeze (odjeljivanja) proteine je potrebno obojati jer inače proteinske vrpce ne bi bile vidljive. Gelovi se bojaju *Coomassie modrilom* (Coomassie Brilliant Blue G-250 ili R-350) ili srebrom. Kada se razdijeljeni proteini u gelu obojaju *Coomassie modrilom*, koji se vežu za aromatske i bazične ogranke proteina, vidljivi su kao tamnoplave vrpce (Strelec, 2009.).

3.MATERIJALI I METODE

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog rada bio je ispitati utjecaj pH ekstrakcije na raspored i intenzitet proteinskih vrpca albumina i globulina tri sorte ječma analizom elektroferograma dobivenih nakon provedene poliakrilamid gel elektroforeze u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata.

3.2. UZORCI, KEMIJE I REAGENCIJE

Ispitano je tri uzorka različitih sorti ječma (Scarlett, Prestige i Vanessa) iz žetve 2012. godine. Akrilamid, bisakrilamid, niskomolekularni standardi proteina, Tris baza, natrijev dodecil-sulfat (SDS), amonijev persulfat (APS), glicin i glicerol dobavljeni su od proizvođača Pharmacia Biotech (Švedska). Kloridna kiselina i n-butanol dobavljeni su od proizvođača Kemika Zagreb (Hrvatska), Bromphenol Blue od proizvođača Merck (Njemačka), a ditiotretitol (DTT) od proizvođača Sigma (SAD).

3.3. EKSTRAKCIJA ALBUMINA I GLOBULINA JEČMA

Brašno određene sorte (1,5 g) pomiješano je sa 7,5 mL: a) hladnog Britton-Robinsonova pufera određenog pH (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 te 11), b) Milli Q vode, c) 0,5 M NaCl ili je d) provedena stupnjevita ekstrakcija u kojoj se u prvom koraku ekstrakcije koristila Milli Q voda, a nakon odvajanja vodenog ekstrakta je preostali talog ekstrahiran pomoću 0,5 M NaCl. Suspenzije su homogenizirane vorteksiranjem tijekom 30 sekundi, te je ekstrakcija pri +4 °C provedena tijekom jednog sata uz vorteksiranje 30 sekundi nakon svakih deset minuta. Po isteku vremena ekstrakti su izbistreni centrifugiranjem pri 15000 g i temperaturi +4 °C tijekom 10 minuta. Dobiveni ekstrakti odvojeni su od taloga dekantiranjem te korišteni za SDS-PAGE.

3.4. PRIPREMA UZORAKA ZA SDS-PAGE

U ekstrakte albumina i globulina ječma (100 μ L) dodano je 100 μ L otopine za denaturaciju proteina sastava: 125 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) glicerol, 0,2 mol L⁻¹ DTT, 0,02 % (w/v) bromfenol modnilo. Pripremljena je otopina zatim homogenizirana vorteksiranjem i izložena temperaturi od 100 °C u trajanju od 5 minuta u termobloku, te su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu i onda dodatno centrifugirani u svrhu uklanjanja eventualno zaostalih aglomerata. Ovako pripremljeni supernatanti korišteni su za SDS-PAGE.

3.5. SDS-PAGE ALBUMINA I GLOBULINA JEČMA

3.5.1. PROVEDBA ELEKTROFOREZE

Razdvajanje proteina pomoću SDS-PAGE-a provedeno je vertikalnim sustavom za elektroforezu – Hoefer SE 600 Ruby, s priređenim gelovima, dimenzija 160 x 180 x 1,5 mm, koji su se sastojali od 40 mm gela za sabijanje (5 % T, 2,6 % C, 0,1 % (w/v) SDS, 125 mmol L⁻¹ Tris-HCl pufer pH 6,8) i 140 mm gela za razdjeljivanje (10 % T, 2,6 % C, 0,1 % (w/v) SDS, 375 mmol L⁻¹ Tris-HCl pufer pH 8,9). Obradeni uzorci i standardi proteina za određivanje molekularne mase elektroforezom nanieseni su u utore gela (20 μ L). Razdjeljivanje proteina provođeno je istovremeno u 2 gela uz pufer za elektroforezu sastava: 25 mmol L⁻¹ Tris, 192 mmol L⁻¹ glicin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3, pri 15°C, tijekom tri sata i četrdeset i pet minuta uz napon 600 V i jakost struje 60 mA, odnosno dok je fronta boje bromfenol modnila stigla do ruba ploče.

3.5.2. BOJANJE PROTEINA

Detekcija proteinskih vrpca provedena je pomoću otopine boje Coomassie Brilliant Blue R-350. Gel je prvo potopljen u 10% otopinu trikloroctene kiseline tijekom 45 minuta radi fiksiranja proteina u gelu, a potom su proteini bojani tijekom noći u otopini za bojanje. Otopina za bojanje pripremljena je miješanjem jednog dijela osnovne otopine za bojanje s jednim dijelom 20% octene kiseline. Osnovna otopina za bojanje

pripremljena je otapanjem jedne tablete PhastGel Blue R-350 u 80 mL destilirane vode te miješanjem deset minuta nakon čega je u otopinu dodano 120 mL metanola, a otopina miješana 30 minuta.

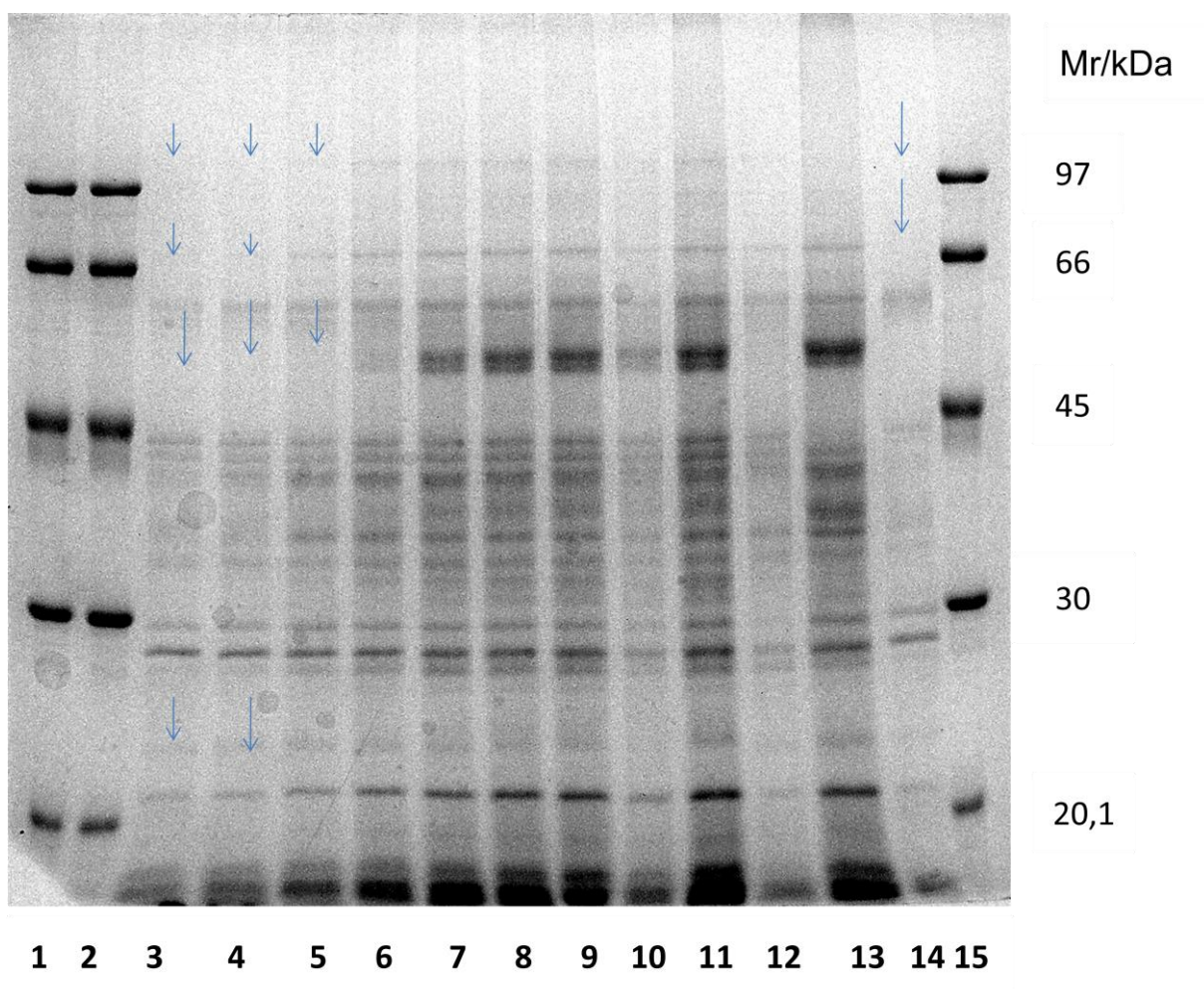
Odbojavanje gela provedeno je pri +50°C u otopini za odbojavanje koja je sadržavala 3 volumna udjela metanola, 1 volumni udio octene kiseline, te 6 volumnih udjela destilirane vode. Postupak odbojavanja proveden je uz 3 izmjene otopine za odbojavanje, odnosno dok nisu jasno uočene tamnoplave proteinske vrpce u bezbojnom gelu. Gel je prije dokumentiranja uronjen u 2-postotnu otopinu glicerola u svrhu impregnacije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako je već navedeno, cilj je ovog završnog rada bio ispitati utjecaj pH ekstrakcije na raspored i intenzitet proteinskih vrpca albumina i globulina tri sorte ječma analizom elektroferograma dobivenih nakon provedene poliakrilamid gel elektroforeze u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata.

4.1. *UTJECAJ pH NA RASPORED PROTEINSKIH VRPCI ALBUMINA I GLOBULINA JEČMA PO PROVEDENOJ SDS-PAGE*

Razdjeljivanje albumina i globulina ispitivanih sorti ječma provedeno je pomoću SDS-PAGE, i to nanošenjem istog volumena uzorka (20 µL) u utore gela. Na takav se način moglo ustanoviti kolika se količina proteina ekstrahira pri točno određenom pH, kao i ustanoviti koje se to proteinske vrpce ekstrahiraju pri točno određenom pH.

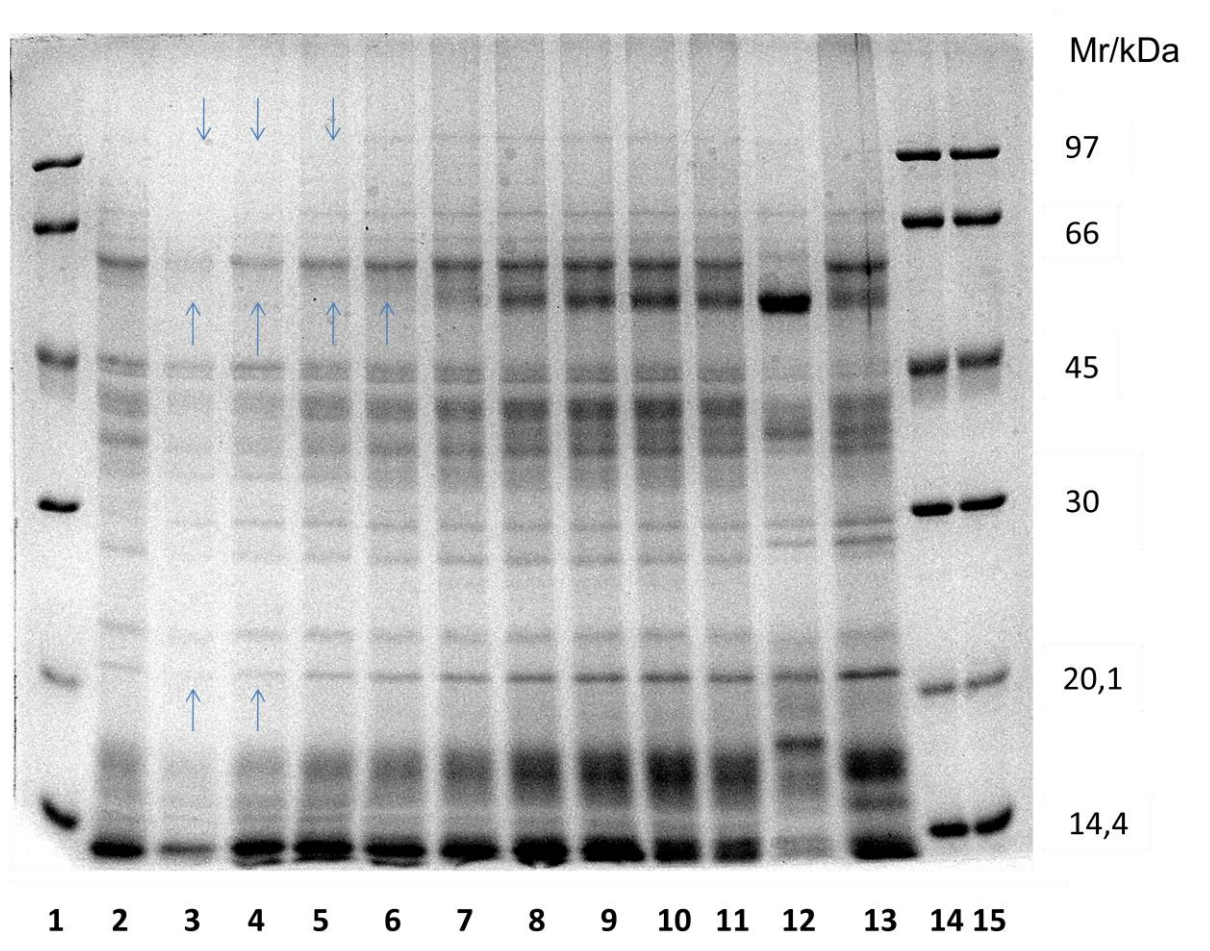


Slika 2. SDS-PAGE albumina i globulina ekstrahiranih iz brašna ječma sorte Scarlett. Linije 1, 2, 15 - niskomolekularni standardi proteina; Linije 3-14 (ekstrakti proteina); Linije 3-11 (ekstrakti proteina u Brittom-Robinsonovom puferu, pH od 3 do 11), te linija 14 (ekstrakt proteina u Brittom-Robinsonovom puferu, pH 3); Linija 12 (albumini ekstrahirani Milli Q vodom); Linija 13 (albuminsko/globulinska frakcija ekstrahirana pomoću 0,5 M NaCl);. Strelice pokazuju uočene vizualne razlike topljivosti proteina ovisno o promjeni pH.

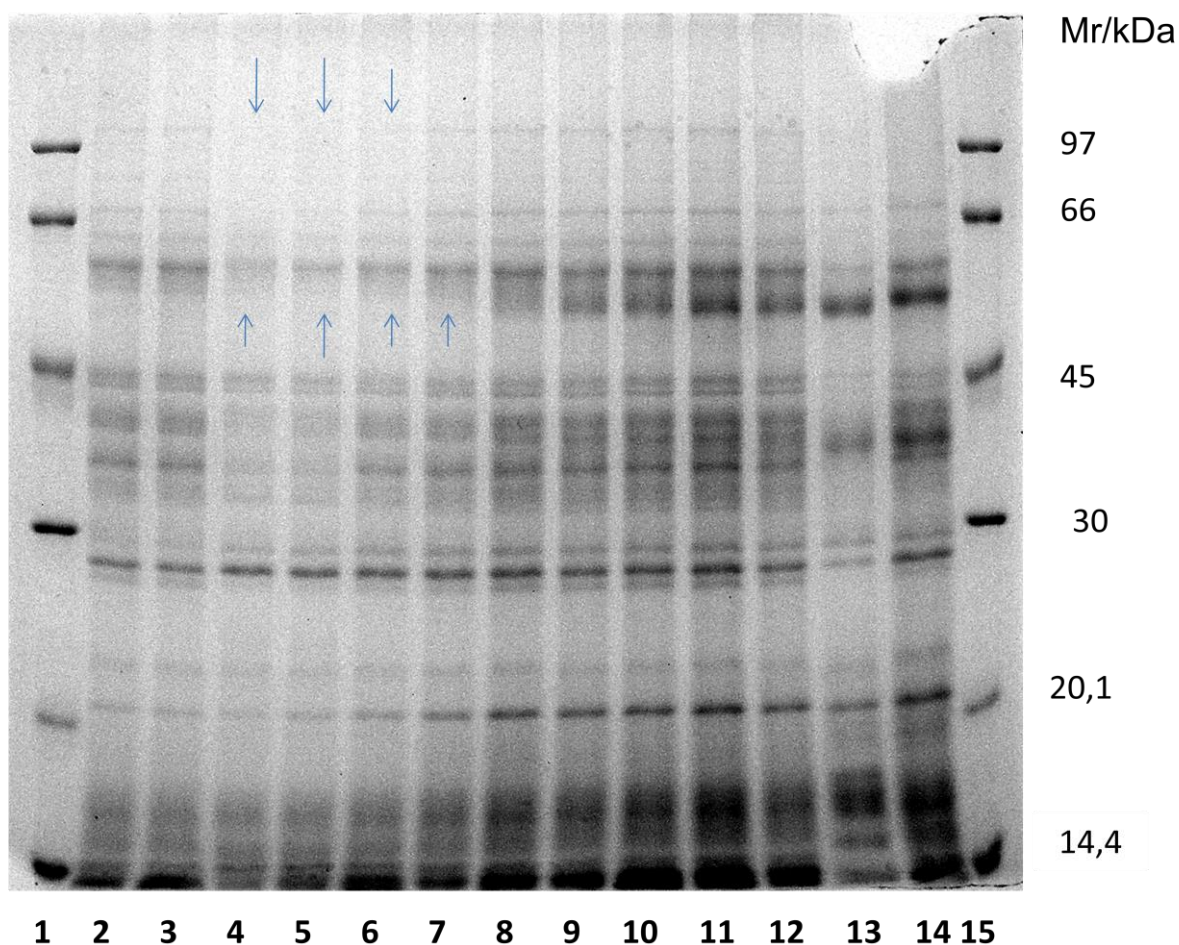
Na slici 2. vidljivo je da topljivost proteina sorte ječma Scarlett raste s povišenjem pH (linije 3-11) što se može uočiti po povećanom intenzitetu obojenja proteinskih vrpce prisutnih pri svim pH vrijednostima, kao i po pojavi dodatnih proteinskih vrpce pri višim pH vrijednostima. Izuzetak čine proteinske vrpce molekulskih masa oko 21, 30 i 43 kDa, čiji se intenzitet promjenom pH ili ne mijenja ili slabo mijenja. Pri pH od 3 do 5 smanjena topljivost proteina (linije 3-5) očito nije samo rezultat smanjenog intenziteta proteinskih vrpce, nego i nedostatka proteinskih vrpce molekulske mase 97, 66 i 50 kDa. Sličan nedostatak vrpce može se uočiti i u slučaju albumina (linija 12) što upućuje da se pri pH vrijednostima od 3 do 5 ekstrahiraju prije svega albumini. Pri višim pH vrijednostima pojavljuje se niz dodatnih proteinskih vrpce znatno jačeg intenziteta (linije 7-11), a kada se ove proteinske vrpce usporede sa albuminsko/globulinskom frakcijom ekstrahiranom pomoću 0,5 M NaCl (linija 13), uočava se vrlo velika sličnost što navodi na zaključak da se pri višim pH vrijednostima ekstrahiraju i albumini i globulini.

Gotovo identičan trend promjena intenziteta i prisutnosti proteinskih vrpce može se uočiti i u slučaju albumina i globulina sorte Prestige (Slika 3), te sorte Vanessa (Slika 4). I kod ove dvije sorte je snižena topljivost proteina u rasponu pH od 3 do 5, uočava se nedostatak istih proteinskih vrpce, te topljivost raste s povišenjem pH. Isto tako se uočava da se proteini ekstrahirani pri pH od 3 do 5 (Slika 3, linije 3-5; Slika 4; linije 4-6) mogu pripisati albuminima (Slika 3, linija 2; Slika 4, linija 2), dok se proteini ekstrahirani pri višim pH vrijednostima (Slika 3, linije 7-11; Slika 4; linije 8-12) mogu pripisati albuminsko-globulinskoj frakciji (Slika 3, linija 13; Slika 4, linija 14).

Štoviše usporedbom rasporeda proteinskih vrpce albumina (Slika 3, linija 2; Slika 4, linija 2) i globulina (Slika 3, linija 12; slika 4, linija 13), sa albuminsko globulinskom frakcijom (Slika 3, linija 13; Slika 4, linija 14) može se uočiti da albuminsko/globulinska frakcija sadrži sve proteinske vrpce sadržane u albuminima i globulinima, što dodatno potvrđuje da se pri višim pH vrijednostima ekstrakcije ekstrahiraju albumini i globulini ječma.



Slika 3. SDS-PAGE albumina i globulina ekstrahiranih iz brašna ječma sorte Prestige. Linije 1, 14, 15 - niskomolekularni standardi proteina; Linija 2 (albumini ekstrahirani Milli Q vodom); Linije 3-13 (ekstrakti proteina); Linije 3-11 (ekstrakti proteina u Brittom-Robinsonovom puferu, pH od 3 do 11); Linija 12 (globulini ekstrahirani iz taloga pomoću 0,5 M NaCl nakon ekstrakcije Milli Q vodom); Linija 13 (albuminsko/globulinska frakcija ekstrahirana pomoću 0,5 M NaCl). Strelice pokazuju uočene vizualne razlike topljivosti proteina ovisno o promjeni pH.



Slika 4. SDS-PAGE albumina i globulina ekstrahiranih iz brašna ječma sorte Vanessa. Linije 1, 15 -niskomolekularni standardi proteina; Linije 2, 3 (albumini ekstrahirani Milli Q vodom); Linije 4-14 (ekstrakti proteina); Linije 4-12 (ekstrakti proteina u Brittom-Robinsonovom puferu, pH od 3 do 11); Linija 13 (globulini ekstrahirani iz taloga pomoću 0,5 M NaCl nakon ekstrakcije Milli Q vodom); Linija 14 (albuminsko/globulinska frakcija ekstrahirana pomoću 0,5 M NaCl). Strelice pokazuju uočene vizualne razlike topljivosti proteina ovisno o promjeni pH.

Iz svega gore navedenog može se zaključiti da:

- topljivost proteina ječma raste s povećanjem pH ekstrakcije,
- se pri rasponu pH od 3 do 5 iz brašna ječma ekstrahiraju albumini,
- se pri pH vrijednostima od 6-11 iz brašna ječma ekstrahiraju albumini i globulini.

5.ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Topljivost proteina ječma raste s povećanjem pH ekstrakcije.
2. U rasponu pH od 3 do 5 iz brašna ječma se ekstrahiraju albumini.
3. U rasponu pH od 6-11 iz brašna ječma se ekstrahiraju albumini i globulini.

6.LITERATURA

- Koehler P, Wieser H: Chemistry of cereal grains. U *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer US, New York, 2013.
- Lásztity R: The chemistry of barley, in: R. Lásztity (Ed.), *Cereal chemistry*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1999, pp. 168-191.
- Osborne TB: Proteins of barley, *Journal of the American Chemical Society* **17** (1895) 539-567.
- Strelec I: Aktivnost aminopeptidaza i sastav proteina sorti ječma. *Magistarski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2004.
- Strelec I: Kemijske i biokemijske promjene starenja zrna pšenice. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2007.
- Strelec I: Metode izolacije i pročišćavanja proteina. U *Pisani materijali uz predavanja*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Strelec I: Praktikum za biokemiju. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek. 2009.
- Strelec I, Has-Schön E and Vitale Lj: Comparative electrophoretic patterns of albumins/globulins extracted from dry grains and green malts of barley varieties. *Poljoprivreda*, 18:36-43, 2012.
- Yalçın E and Çelik S: Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chemistry*, 104:1641-1647, 2007.